

N 38216 EP DE G/P18



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Übersetzung der
europäischen Patentschrift

97 EP 1 073 339 B 1

10 DE 699 04 161 T 2

51 Int. Cl. 7:
A 21 D 8/04
A 21 D 2/26

- 21 Deutsches Aktenzeichen: 699 04 161.9
- 36 PCT-Aktenzeichen: PCT/DK99/00185
- 36 Europäisches Aktenzeichen: 99 911 638.7
- 37 PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/053769
- 38 PCT-Anmeldetag: 30. 3. 1999
- 37 Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 28. 10. 1999
- 37 Erstveröffentlichung durch das EPA: 7. 2. 2001
- 37 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 27. 11. 2002
- 47 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 17. 7. 2003

30 Unionspriorität:
54398 20. 04. 1998 DK

73 Patentinhaber:
Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

74 Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,
Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, NL,
PT, SE

72 Erfinder:
SPENDLER, Tina, DK-2880 Bagsv rd, DK; NILSSON,
Lone, CH-4102 Binningen, CH; FUGLSANG, Crone,
Claus, DK-2880 Bagsv rd, DK

54 HERSTELLUNG VON TEIG SOWIE BACKPRODUKTEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 699 04 161 T 2

DE 699 04 161 T 2

BEST AVAILABLE COPY

EP 1073339 (99911638.7)
Novozymes A/S

10. Februar 2003
N38216EPDE G/brä

EINE MALTOGENE ALPHA-AMYLASE

5 GEBIET DER ERFINDUNG

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines Teiges oder eines aus dem Teige hergestellten Backproduktes. Insbesondere bezieht sie sich auf ein solches Verfahren, in dem das Brot eine verbesserte Weichheit hat, sowohl
10 wenn es am gleichen Tag gegessen wird oder wenn es nach mehreren Tagen der Lagerung gegessen wird.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

15 Es ist allgemein bekannt, dass sich die Weichheit von Brot während der Lagerung vom Zeitpunkt des Backens bis zum Zeitpunkt des Konsums verschlechtert. Der Begriff des Absteehens (staling) wird verwendet, um solche unerwünschten Veränderungen in den Eigenschaften des Brotes zu beschreiben. Abstehen führt zu einer Zunahme der Festigkeit der Krume, einer Verminderung der Elastizität der Krume
20 und Veränderungen in der Kruste, die hart und lederartig wird.

Enzymatisches Hinauszögern des Absteehens mittels verschiedener Amylasen ist beschrieben worden. Daher beschreiben US 2,615,810; US 3,026,205 und O. Silberstein, "Heat-Stable Bacterial Alpha-Amylase in Baking", Baker's Digest 38(4),
25 Aug. 1964, pp. 66-70 und 72, die Verwendung von Alpha-Amylase. WO 91/04669 (Novo Nordisk) beschreibt den Gebrauch von einer maltogenen Alpha-Amylase aus *Bacillus stearothermophilus*. Auch die Verwendung von β -Amylase zum Hinauszögern des Absteehens ist bekannt.

Es ist ferner bekannt, eine Phospholipase dem Teig zuzusetzen. Daher offenbaren US 4,567,046 und EP 171,995 (beide von Kyowa Hakko), dass die Zugabe von Phospholipase A die Eigenschaften von Teig und Brot, einschließlich des Hinauszögerns des Abstehens verbessert.

5

M.R. Kweon et al., Journal of Food Science, 59 (5), 1072-1076 (1994) offenbaren die Wirkung von bei 2 - 4 Gew.-% von Phospholipidhydrolysat zusammen mit einer Anti-Abstehens-Amylase (antistaling-amylase) auf die Retrogradation von Stärke in Brot.

10

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Die Erfinder bestätigen, dass die Zugabe von einer maltogenen Alpha-Amylase die Rate der Krumenverfestigung während der Lagerung von 1-7 Tagen nach Backen vermindert, aber sie fanden ferner heraus, dass es ein Bedürfnis zur Verbesserung der Weichheit in der Anfangsperiode nach dem Backen, insbesondere in den ersten 24 Stunden nach dem Backen gibt. Sie fanden ferner heraus, dass dies durch Einsatz einer Phospholipase vollbracht werden kann, sodass ein durch kombinierte Verwendung von einer maltogenen Alpha-Amylase und einer Phospholipase hergestelltes Brot eine verbesserte Weichheit aufweist, sowohl wenn es am gleichen Tag gegessen wird als auch wenn es mehrere Tage nach dem Backen gelagert gegessen wird. Es gibt keine signifikante Veränderung in dem Geschmack oder Geruch des Backproduktes.

25 Die Erfindung stellt daher ein Verfahren zur Herstellung eines Teigs oder eines aus diesem Teig hergestellten Backproduktes bereit, das den Zusatz von einer maltogenen Alpha-Amylase und einer Phospholipase zu dem Teig umfasst. Die Erfindung stellt ferner einen Teig und eine Vor-Mischung enthaltend diese Ingredienzien bereit.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Maltogene Alpha-Amylase

- 5 Die erfindungsgemäß verwendete maltogene Alpha-Amylase kann eine beliebige Amylase sein, die wirksam ist im Hinauszögern des Abstehens (Krumenverfestigung) von Backprodukten.

- 10 In Gegenwart von Stärke hat die Amylase vorzugsweise ein Temperaturoptimum im Bereich vom 30-90 °C, vorzugsweise 50-80 °C, insbesondere 55-75 °C, z.B. 60-70 °C. Das Temperaturoptimum kann in einer 1%-Lösung von löslicher Stärke bei pH 5,5 gemessen werden.

- 15 Die maltogene Alpha-Amylase (EC 3.2.1.133) kann aus *Bacillus* sein. Eine maltogene Alpha-Amylase aus *B. stearothermophilus* Stamm NCIB 11837 ist kommerziell unter dem Handelsnamen Novamyl® von Novo Nordisk A/S erhältlich. Sie ist ferner in US 4,598,048 und US 4,604,355 und in C. Christophersen et al., Starch, vol. 50, Nr. 1, 39-45 (1997) beschrieben.

- 20 Die maltogene Alpha-Amylase wird in einer zum Hinauszögern des Abstehens (Krumenverfestigung) des Backprodukt wirksamen Menge zugesetzt. Die Menge der maltogenen Alpha-Amylase wird typischerweise in dem Bereich von 0,01-10 mg Enzymprotein pro kg Mehl, z.B. 1-10 mg/kg sein. Die maltogene Alpha-Amylase wird vorzugsweise in einer Menge von 50-5000 MANU/kg Mehl zugesetzt, z.B. 100-1000 MANU/kg. Eine MANU (Maltogenic Amylase Novo Unit)
- 25 kann als die Enzymmenge definiert werden, die zum Freisetzen 1 µmol Maltose pro Minute bei einer Konzentration von 10 mg Maltotriose (Sigma M 8378) Substrat pro ml 0,1M Zitratpuffer, pH 5,0 bei 37 °C für 30 Minuten erforderlich ist.

Phospholipase

Die Phospholipase kann eine A₁ oder A₂ Aktivität besitzen, um Fettsäure von dem Phospholipid zu entfernen und um ein Lysophospholipid zu bilden. Sie kann oder
 5 kann nicht Lipaseaktivität aufweisen, d.h. Aktivität auf Triglyzeride. Die Phospholipase hat vorzugsweise ein Temperaturoptimum im Bereich von 30-90 °C, z.B. 30-70 °C.

Die Phospholipase kann tierischen Ursprungs sein, z.B. aus Pankreas (z.B. Rinder- oder Schweinepankreas), Schlangengift oder Bienengift. Alternativ kann die
 10 Phospholipase mikrobischen Ursprungs sein, z.B. von filamentösen Pilzen, Hefe oder Bakterien, wie z.B. dem Genus oder der Spezies *Aspergillus*, *A. niger*, *Dicystostelium*, *D. discoideum*, *Mucor*, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*, *Neurospora*, *N. crassa*, *Rhizomucor*, *R. pusillus*, *Rhizopus*, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*, *Sclerotinia*, *S. libertiana*, *Trichophyton*, *T. rubrum*, *Whetzelinia*,
 15 *W. sclerotiorum*, *Bacillus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Citrobacter*, *C. freundii*, *Enterobacter*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*, *Erwinia*, *E. herbicola*, *Escherichia*, *E. coli*, *Klebsiella*, *K. pneumoniae*, *Proteus*, *P. vulgaris*, *Providencia*, *P. stuartii*, *Salmonella*, *S. typhimurium*, *Serratia*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*, *Shigella*, *S. flexneri*, *Streptomyces*, *S. violeceoruber*, *Yersinia* oder *Y. enterocolitica*. Eine bevorzugte Phospholipase entstammt einem Stamm von *Fusarium*, insbesondere *F. oxysporum*, z.B. vom Stamm DSM 2672, wie in der anhängigen PCT/DK 97/00557 beschrieben.

25 Die Phospholipase wird in einer Menge zugesetzt, die die Weichheit des Brotes während der Anfangsperiode nach dem Backen verbessert, insbesondere in den ersten 24 Stunden. Die Phospholipasemenge wird typischerweise in dem Bereich von 0,01-10 mg Enzymprotein pro kg Mehl (z.B. 0,1-5 mg/kg) oder 200-5000 LEU/kg Mehl (z.B. 500-2000 LEU/kg) liegen.

30

Eine Phospholipase mit Lipaseaktivität wird vorzugsweise in einer der Lipaseaktivität von 20-1000 LU/kg Mehl entsprechenden Menge, insbesondere 50-500

LU/kg, zugesetzt. Eine LU (Lipase Unit) ist als die Menge Enzym definiert, die zum Freisetzen von 1 μ mol Buttersäure pro Minute bei 30,0 °C; pH 7,0; mit *Gummi arabicum* als Emulgator und Tributyrin als Substrat erforderlich ist.

5 Phospholipaseaktivität (LEU)

In dem LEU-Assay wird die Phospholipaseaktivität durch die Fähigkeit bestimmt, Lecithin bei pH 8,0, 40 °C zu hydrolysieren. Die Hydrolysereaktion kann von Titration mit NaOH für eine Reaktionszeit von 2 Minuten gefolgt sein. Die Phospholipase aus Schweinepankreas hat eine Aktivität von 510 LEU/mg (als Standard genommen) und die Phospholipase von *Fusarium oxysporum* hat eine Aktivität von 1540 LEU/mg.

Phospholipid

Die Phospholipase kann auf Phospholipid wirken, das vom Mehl in dem Teig bereitgestellt wird, sodass der getrennte Zusatz von einem Phospholipid nicht erforderlich ist. Allerdings kann die Weichmacherwirkung durch Zusatz eines Phospholipids erhöht werden, vorzugsweise in einer Menge von 0,05-20 g/kg Mehl, z.B. 0,1-10 g/kg. Das Phospholipid kann ein Diacylglycerinphospholipid, wie z.B. Lecithin oder Cephalin, sein.

Teig

Der erfindungsgemäße Teig enthält im Allgemeinen Weizenschrot oder Weizenmehl und/oder andere Arten von Schrot, Mehl oder Stärke wie Maismehl, Maisstärke, Roggenschrot, Roggenmehl, Hafermehl, Haferschrot, Sojamehl, Hirschrot, Hirsemehl, Kartoffelschrot, Kartoffelmehl oder Kartoffelstärke.

Der erfindungsgemäße Teig kann frisch, gefroren oder vorgebacken (par-baked) sein.

Der erfindungsgemäße Teig ist normalerweise ein gesäuerter Teig oder ein Teig, der Säuerung zu unterziehen ist. Der Teig kann auf verschiedenen Wegen gesäuert werden, wie z.B. durch Zusatz chemischer Säuerungsmittel, z.B. Natriumbikarbonat, oder durch Zusatz eines Sauerteigs (Fermentierungsteig), aber es ist
5 bevorzugt, den Teig durch Zusatz einer geeigneten Hefekultur zu säuern, wie z.B. einer Kultur von *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe), z.B. einem kommerziell erhältlichen Stamm von *S. cerevisiae*.

Der Teig kann ferner andere übliche Teigingredienzien enthalten, z.B.: Proteine, wie z.B. Milchpulver, Kleber und Soja; Eier (entweder ganze Eier, Eigelbe oder Eiweiße); ein Oxidationsmittel wie Ascorbinsäure, Kaliumbromat, Kaliumjodat, Azodicarbonamid (ADA) oder Ammoniumpersulfat; eine Aminosäure wie L-Cystein; ein Zucker; ein Salz wie Natriumchlorid, Kalziumazetat, Natriumsulfat oder Kalziumsulfat.
10

Der Teig kann Fett (Triglyzerid) wie granuliertes Fett oder Backfett enthalten, aber die Erfindung ist insbesondere anwendbar auf einen Teig, bei dem weniger als 1 Gew.-% Fett (Triglyzerid) zugesetzt wird und insbesondere auf einen Teig, der ohne Zusatz von Fett hergestellt wird.
15

Der Teig kann ferner einen Emulgator wie Mono- oder Diglyzeride, Diazetylweinsäureester von Mono- oder Diglyzeriden, Zuckerester von Fettsäuren, Polyglyzerinester von Fettsäuren, Milchsäureester von Monoglyzeriden, Essigsäureester von Monoglyzeriden, Polyoxyethylenstearate oder Lysolecithin enthalten, aber die Erfindung ist insbesondere anwendbar auf einen Teig, der ohne Zusatz von anderen Emulgatoren als gegebenenfalls Phospholipid hergestellt wird.
20
25

Zusätzliches Enzym

Gegebenenfalls kann ein zusätzliches Enzym zusammen mit der maltogenen Alpha-Amylase und der Phospholipase verwendet werden. Das zusätzliche Enzym
30

kann eine zweite Amylase, wie eine Amyloglukosidase, eine Beta-Amylase, eine Cyclodextringlukantransferase, oder das zusätzliche Enzym kann eine Peptidase, insbesondere eine Exopeptidase, eine Transglutaminase, eine Lipase, eine Zellulase, eine Hemizellulase, insbesondere eine Pentosanase wie Xylanase, eine Protease, eine Proteindisulfidisomerase, z.B. eine Proteindisulfidisomerase wie in WO 95/00636 beschrieben, eine Glykosyltransferase, ein Verzweigungsenzym (1,4- α -Glukan-Verzweigungsenzym) (glukan branching enzyme), eine 4- α -Glukanotransferase (Dextrin Glykosyltransferase) oder eine Oxidoreductase, z.B. eine Peroxidase, eine Lakkase, eine Glukoseoxidase, eine Pyranoseoxidase, eine Lipoxygenase, eine L-Aminosäureoxidase oder eine Carbohydratoxidase sein.

Das zusätzliche Enzym kann von irgendeinem Ursprung sein, einschließlich Säuger oder Pflanze, und vorzugsweise von mikrobischem (bakteriellem, Hefe- oder Pilz-) Ursprung und kann mittels gewöhnlicher im Stand der Technik verwendeter Verfahren erhalten werden.

Die Xylanase ist vorzugsweise mikrobischen Ursprungs, z.B. stammend aus einem Bakterium oder Pilz, wie dem Stamm *Aspergillus*, insbesondere *A. aculeatus*, *A. niger* (siehe WO 91/19782), *A. awamori* (WO 91/18977) oder *A. tubigenis* (WO 92/01793), von einem *Trichoderma*-Stamm, z.B. *T. reesei* oder von einem Stamm von *Humicola*, z.B. *H. insolens* (WO 92/17573, dessen Inhalt hiermit per Referenz eingeschlossen ist). Pentopan® und Novozym 384® (beide von Novo Nordisk A/S) sind kommerziell erhältliche Xylanasezubereitungen, die von *Trichoderma reesei* produziert werden.

Die Amyloglukosidase kann eine *A. niger*-Amyloglukosidase (wie AMG™, erhältlich von Novo Nordisk A/S, Dänemark) sein. Andere zweckmäßige Amylaseprodukte schließen Grindamyl® A 1000 oder A 5000 (erhältlich von Grindsted Products, Dänemark) und Amylase® H oder Amylase® P (erhältlich von Gist-Brocades, Niederlande) ein.

Die Glukoseoxidase kann eine Glukoseoxidase aus Pilzen sein, insbesondere eine *Aspergillus niger*-Glukoseoxidase (wie Gluzyme[®], erhältlich von Novo Nordisk A/S, Dänemark).

- 5 Die Protease kann insbesondere Neutrase[®] (erhältlich von Novo Nordisk A/S, Dänemark) sein.

Die Lipase kann aus einem Stamm von *Thermomyces (Humicola)*, *Rhizomucor*, *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus* oder *Pseudomonas*, insbesondere von *Thermomyces lanuginosus (Humicola lanuginosa)*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*,
10 *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* oder *Rhizopus arrhizus* oder *Pseudomonas cepacia* stammen. In spezifischen Ausführungsformen kann die Lipase Lipase A oder Lipase B stammend aus *Candida antarctica* wie in WO 88/02775 beschrieben sein, oder die Lipase stammend aus *Rhizomucor miehei* wie in EP 238,023
15 beschrieben, oder *Humicola lanuginosa* beschrieben in EP 305,216 oder *Pseudomonas cepacia* wie in EP 214,761 und WO 89/01032 beschrieben.

Backprodukt

- 20 Das erfindungsgemäße Verfahren kann für jede beliebige Art aus Teig hergestelltem Backprodukt sein, das entweder von einer weichen oder von einer knusprigen Art ist, entweder von einem weißen, hellen oder dunklen Typ ist. Beispiele sind Brot (insbesondere Weiß-, Vollkorn- oder Roggenbrot), typischerweise in der Form von Laiben oder Brötchen, französischer Baguette-Typ Brot, Pitabrot, Tortillas, Kuchen, Pfannkuchen, Biskuits, Kekse, Tortenböden, knuspriges Brot (crisp
25 bread), gedampftes Brot (steamed bread), Pizza und so weiter.

Vor-Mischung

- 30 Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf eine Vor-Mischung enthaltend Mehl zusammen mit einer maltogenen Alpha-Amylase, einer Phospholipase und einem Phospholipid. Die Vor-Mischung kann andere Teig-verbessernde und/oder

Brot-verbessernde Zusatzstoffe, z.B. irgendwelche von den oben erwähnten Zusatzstoffen einschließlich Enzyme enthalten.

Enzymzubereitung

5

Die Erfindung stellt eine Enzymzubereitung bereit enthaltend maltogene Alpha-Amylase und eine Phospholipase zum Einsatz als Backzusatzstoff in dem erfindungsgemäßen Verfahren. Die Enzymzubereitung ist vorzugsweise in der Form eines Granulats oder agglomertierten Pulvers. Es hat vorzugsweise eine enge
10 Verteilung der Teilchengröße, wobei mehr als 95 % (pro Gewicht) der Teilchen in dem Bereich von 25 bis 500 µm liegen.

Granulate und agglomerierte Pulver können mittels gewöhnlicher Methoden, z.B. durch Aufsprühen der Amylase auf einen Träger in einem Flüssigbett-Granulator
15 hergestellt werden. Der Träger kann aus Teilchenkernen einer geeigneten Teilchengröße bestehen. Der Träger kann löslich oder unlöslich, z.B. ein Salz (wie NaCl oder Natriumsulfat), ein Zucker (wie Saccharose oder Laktose), ein Zuckeralkohol (wie Sorbit), Stärke, Reis, Maisgrütze oder Soja sein.

20 BEISPIELE

Beispiel 1

Brot wurde mit maltogener Alpha-Amylase, Phospholipase und Phospholipid ge-
25 backen. Zur Kontrolle wurde auch Brot ohne eine oder mehrere dieser Ingredienzien gebacken.

Das Phospholipid war Lecithin bei einer Dosierung von 10 g/kg. Die Phospholipase war aus *Fusarium oxysporum*, eingesetzt bei einer Dosierung von 50, 250 oder 500 LU/kg, entsprechend oder 0,04, 0,19 oder 0,38 mg/kg. Die Anti-
30 Absteigens-Amylase (anti-staling amylase) war eine maltogene Alpha-Amylase aus *B. stearothermophilus* (Novamyl) bei einer Dosierung von 750 MANU/kg (1 mg/kg). Alle Dosierungen in den Beispielen basierten auf kg Mehl.

- Teige wurden gemäß einem europäischen Standardverfahren der Grundteigzubereitung (standard European straight dough procedure) mit 50 g Hefe pro kg Mehl und 40 ppm Ascorbinsäure hergestellt. Die Teige wurden auf 350 g abgemessen und in Backformen mit Deckel gebacken.

- Die Krumenfestigkeit wurde unter Einsatz eines Texturanalysators TA-XT2 von Stable Micro Systems gemessen. Die Textur wurde gemäß einer modifizierten ACCA-Methode (American Cereal Chemists' Association) gemessen. Diese Messungen wurden nach 0 Tagen (ungefähr 2 Stunden nach Backen) und erneut nach 1, 2 und 7 Tagen Lagerung (eingewickelt in doppelte Plastiktüten und bei 22 °C gelagert) durchgeführt.

Die Ergebnisse sind als Festigkeit versus Zusatz und Lagerzeit dargestellt:

Zusatzstoffe	Phospholipase-dosierung (LU/kg)	2 Stunden	1 Tag	2 Tage	7 Tage
Erfindung:					
maltogene Alpha-Amylase +	50	316	417	517	868
Phospholipase +	250	279	371	455	790
Phospholipid	500	248	324	410	752
Kontrolle:					
keine (Kontrolle)	0	296	875	1207	2162
maltogene Alpha-Amylase	0	469	563	801	1083
Phospholipid +	50	208	470	782	1560
Phospholipase	250	231	467	721	1424
	500	233	420	649	1303

Beispiel 2

Ein Backtest wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt, aber mit Dosierungen von 0,5 mg/kg der Phospholipase (770 LEU/kg) und 1g/kg des Phospholipids. Die Ergebnisse sind als Festigkeit nach Lagerung angegeben und zum Vergleich ist die Festigkeit auch in % der Kontrolle ausgedrückt.

Zusatzstoffe	2 Stunden	5 Stunden	12 Stunden	20 Stunden	Tag 2	Tag 3
Erfindung: maltogene alpha-Amylase + Phospholipase + Phospholipid	181 (78%)	195 (65%)	223 (51%)	241 (46%)	277 (34%)	303 (32%)
Kontrolle: keine (Kontrolle)	233 (100%)	302 (100%)	434 (100%)	526 (100%)	824 (100%)	959 (100%)
maltogene Alpha-Amylase	372 (160%)	468 (155%)	518 (119%)	482 (92%)	547 (66%)	637 (66%)
Phospholipid + Phospholipase	144 (62%)	144 (47%)	212 (49%)	258 (49%)	364 (44%)	482 (50%)

10 Beispiel 3

Ein Backtest wurde wie in Beispielen 1 und 2 durchgeführt unter Verwendung einer anderen Phospholipase. Die Phospholipase war aus Schweinepankreas bei einer Dosierung von 2 mg/kg (1020 LEU/mg). Die Dosierungen der maltogenen Alpha-Amylase und des Phospholipids waren wie in Beispiel 2, und die Ergebnisse sind wie in Beispiel 2 dargestellt:

Zusatzstoffe	2 Stunden	5 Stunden	12 Stunden	20 Stunden	Tag 2	Tag 3
Erfindung: maltogene alpha-Amylase + Phospholipase + Phospholipid	342 (122%)	411 (103%)	420 (80%)	431 (73%)	485 (52%)	559 (48%)
Kontrolle: keine (Kontrolle)	281 (100%)	398 (100%)	524 (100%)	588 (100%)	937 (100%)	1157 (100%)
maltogene Alpha-Amylase	409 (146%)	490 (123%)	514 (98%)	526 (89%)	625 (67%)	673 (58%)
Phospholipid + Phospholipase	218 (76%)	260 (65%)	367 (70%)	472 (80%)	668 (71%)	906 (78%)

Die Ergebnisse der Beispiele 1-3 zeigen, dass der Zusatz von maltogener Alpha-Amylase die Krumenverfestigung während der Lagerung hinauszögert, indes die
 5 initiale Festigkeit verglichen mit der Kontrolle ohne Zusatzstoffe erhöht. Der Zusatz von erfindungsgemäßigem Phospholipid + Phospholipase ist wirksam zur Vermeidung der erhöhten initialen Festigkeit und reduziert weiter die Rate der Krumenverfestigung während der Lagerung, verglichen mit der maltogenen Alpha-Amylase alleine.

10

Beispiel 4

Brotlaibe wurden mit oder ohne Phospholipid (Lecithin) wie unten gezeigt gebacken. Die Phospholipase war *F. oxysporum* verwendet bei einer Dosierung von 1
 15 mg/kg (1540 LEU/kg). Die maltogene Alpha-Amylase und die Backbedingungen waren wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Ergebnisse sind als Festigkeit nach Lagerung angegeben:

				Festigkeit		
	Maltogene Alpha- Amylase	Phospho- lipase mg/kg	Phospholipid g/kg	2 Stun- den	1 Tag	3 Tage
Kontrolle	0	0	0	294	687	1179
Erfindung	750	1	10	200	229	277
	750	1	2	167	218	287
	750	1	1	167	232	305
	750	1	0,5	189	269	333
	750	1	0,1	196	260	381
	750	1	0	199	264	372

Die Ergebnisse zeigen, dass Zusatz von maltogener Alpha-Amylase und Phospho-
 5 lipase die Weichheit deutlich verbessern, sowohl die initiale Weichheit (2 Stun-
 den) und Weichheit nach Lagerung (3 Tage). Der Weichmachereffekt kann weiter
 verbessert werden durch Zusatz von Phospholipid. Die optimale Dosierung
 scheint ungefähr 1 mg/kg Phospholipid zu sein.

EP 1073339 (99911638.7)
Novozymes A/S

10. Februar 2003
N38216EPDE G/brä

ANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines Teigs oder eines aus dem Teig hergestellten Backproduktes, dass das Einschließen einer maltogenen Alpha-Amylase und einer Phospholipase in den Teig umfasst.
5
2. Das Verfahren nach dem vorangehenden Anspruch, wobei die maltogene Alpha-Amylase in Brot eine optimale Aktivität bei 70-90 °C aufweist.
10
3. Das Verfahren nach jedem vorangehenden Anspruch, wobei die maltogene Alpha-Amylase aus *B. stearotheophilus*, vorzugsweise vom Stamm NCIB 11837 ist.
- 15 4. Verfahren nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, wobei die Phospholipase ein Temperaturoptimum von 30-70 °C hat.
5. Verfahren nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, wobei die Phospholipase aus Pilzen stammt, vorzugsweise aus *Fusarium*, besonders bevorzugt aus *F. oxysporum*.
20
6. Verfahren nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, das darüber hinaus das Einschließen eines Phospholipids (vorzugsweise Lecithin) in den Teig umfasst.
- 25 7. Verfahren nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, das nicht den Zusatz von Fett umfasst.

8. Verfahren nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, das nicht den Zusatz von Lysophospholipid umfasst.
9. Verfahren nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, das nicht den Zusatz von anderen Emulgatoren als das Phospholipid umfasst.
10. Verfahren nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, wobei der Teig im Wesentlichen aus Mehl, Wasser, Hefe, Salz und Zucker besteht.
11. Teig, der eine maltogene Alpha-Amylase und eine Phospholipase einschließt.
12. Vor-Mischung für Teig, die Mehl, eine maltogene Alpha-Amylase und eine Phospholipase umfasst.
13. Enzymzubereitung, die eine maltogene Alpha-Amylase und eine Phospholipase umfasst.
14. Zubereitung nach dem vorangehenden Anspruch, die darüber hinaus ein Phospholipid, vorzugsweise Lecithin, umfasst.
15. Zubereitung nach Anspruch 13 oder 14, die darüber hinaus eine Hemizellulase, vorzugsweise eine Pentosanase, besonders bevorzugt eine Xylanase, umfasst.
16. Zubereitung nach irgendeinem der Ansprüche 13-15, die eine Granulat oder ein agglomeriertes Pulver ist.
17. Zubereitung nach irgendeinem der Ansprüche 13-16, wobei mehr als 95 (Gew.-%) eine Teilchengröße zwischen 25 und 500 µm hat.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.